

BEST AVAILABLE COPY**Synthesis of poly deoxynucleosides, synthesis of chromosome DNA, and method for preparing chromosome****Publication number:** CN1177008**Publication date:** 1998-03-25**Inventor:** TAKANORI MIURA (JP); NORIO OGATA (JP)**Applicant:** TAIKO PHARMACEUTICAL CO LTD (JP)**Classification:****- international:** **C12N15/90; C12P19/34; C12Q1/68; C12N15/87; C12P19/00; C12Q1/68; (IPC1-7): C12P19/34; C12N9/00; C12N15/52; C12Q1/68****- european:** C12N15/90; C12P19/34; C12Q1/68D**Application number:** CN19970110914 19970418**Priority number(s):** JP19960122673 19960419; JP19960156647 19960618**Also published as:**

EP0802258 (A2)

US5917031 (A1)

EP0802258 (A3)

CN1209464C (C)

Report a data error here

Abstract not available for CN1177008

Abstract of corresponding document: **EP0802258**

The invention relates to a method of synthesizing polydeoxyribonucleotides which comprises causing a thermostable deoxyribonucleotide polymerase to act on deoxyribonucleotides without using any template and any primers, to the thus-obtained polydeoxyribonucleotides, to a method of screening cDNA libraries using the same as probes, to a method comprising joining the DNA resulting from the above method of synthesis to the 3'-OH terminus of a double-stranded DNA containing a gene derived from cells of a living organism, followed by transfection of such cells with the product of joining and culture of the cells, to thereby cause insertion of the product into chromosomal DNA and production of the protein encoded by the gene, to a method of synthesizing chromosomal DNA and to a method of synthesizing chromosomes. According to the invention, it is possible to create DNA not occurring in the nature and create novel proteins using the thus created genes, hence means for providing novel physiologically or pharmacologically active substances can be provided.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[19]中华人民共和国专利局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97110914.1

[51] Int. Cl.⁶

C12P 19/34

C12N 9/00 C12N 15/52

C12Q 1/68

[43] 公开日 1998 年 3 月 25 日

[11] 公开号 CN 1177008A

[22] 申请日 97.4.18

[30] 优先权

[32] 96.4.19 [33] JP[31] 122673 / 96

[32] 96.6.18 [33] JP[31] 156647 / 96

[71] 申请人 大幸药品株式会社

地址 日本大阪

[72] 发明人 三浦幸典 绪方规男

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所
代理人 殷承恩

权利要求书 4 页 说明书 28 页 附图页数 10 页

[54] 发明名称 多脱氧核苷酸的合成方法、染色体
DNA 的合成方法以及染色体的制造方
法

[57] 摘要

本发明提供在没有模板和引物存在的条件下使耐热性的脱氧核苷酸聚合酶作用于脱氧核苷酸合成多脱氧核苷酸的合成方法；以这样得到的多脱氧核苷酸作探针筛选 cDNA 文库的筛选方法；以及将上述合成的 DNA 结合到含有生物细胞的基因的双链 DNA 的 3' -OH 末端，然后用它转化细胞，通过培养该细胞使 DNA 插入染色体 DNA，使来自该基因的蛋白表达的方法；染色体 DNA 的合成方法以及染色体的合成方法。还可提供创造天然不存在的 DNA，再通过该基因创造新的蛋白质，提供新的生理的、药理活性物质的手段。

(BJ) 第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 一种多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 在没有模板和/或引物的存在下, 加热含有脱氧核苷酸和蛋白质的反应液, 使其按规定时间反应, 使脱氧核苷酸聚合。

2. 如权利要求 1 中记载的多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 上述蛋白质是耐热性的脱氧核苷酸聚合酶。

3. 如权利要求 2 中记载的多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 上述耐热性脱氧核苷酸聚合酶是属于 *Thermococcus* 属的细菌的脱氧核苷酸聚合酶或是属于 *Thermus* 属的细菌的脱氧核苷酸聚合酶。

4. 如权利要求 3 中记载的多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 属于上述 *Thermococcus* 属的细菌是 *Thermococcus litoralis*。

5. 如权利要求 3 中记载的多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 属于 *Thermus* 的细菌是 *Thermus thermophilus* 和 *Thermus aquaticus*。

6. 如权利要求 4 记载的多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 上述的脱氧核苷酸至少都含有脱氧腺苷 5'-三磷酸 (dATP) 和脱氧胸腺嘧啶核苷 5'-三磷酸 (dTTP)。

7. 如权利要求 6 记载的多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 上述脱氧核苷酸还含有脱氧胞嘧啶核苷 5'-三磷酸 (dCTP) 和脱氧鸟苷 5'-三磷酸 (dGTP) 或不含有 dGTP。

8. 如权利要求 1 或权利要求 2 记载的多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 在大约 20~90℃ 的温度下进行反应。

9. 如权利要求 1 或权利要求 2 记载的多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 在大约 60~90℃ 的温度下进行反应。

10. 如权利要求 1 或权利要求 2 记载的多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 在弱酸性、中性或弱碱性的溶液条件下进行反应。

11. 如权利要求 1 或权利要求 2 记载的多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 反应是在 pH6~10 条件下进行的。

12. 一种多脱氧核苷酸的合成方法, 其特征在于, 是经过以下工序合成的,

13	0.3
14	0.6
15	0.2
16	0.5
17	0.7
18	256
19	0.2
20	0.3

本发明正是基于包括上述进展在内的许多新的发现，涉及如下内容：在模板和引物不存在而有蛋白质存在条件下使脱氧核苷酸聚合为特征的 DNA 合成法；通过这一方法合成的多脱氧核苷酸；使这个 DNA 转染细胞，再通过培养转染了的细胞创造出新的 DNA 的方法；以及这个 DNA 和其用途。

本发明的 ntp - DNA 合成方法，如上所述，是在不存在模板和引物而有蛋白质存在条件下进行的。虽然聚合反应是通过 DNA 聚合酶进行的，但也可将该聚合物本身作为蛋白质使用。所说的聚合酶也可以用别的蛋白质代替。

优选的聚合酶大约在 20 °C 以上不失活，理想的是在大约 60 °C 以上也不失活，最理想的聚合酶即使在大约 70 °C 以上也不失活。例如属于 *Thermococcus* 属的细菌 DNA 聚合酶除了上述的 *Thermococcus litoralis* 的 DNA 聚合酶 (Vent DNA Polymerase (trademark), New England Biolabs) 以外还有 *Thermococcus Profundus* (ATCC 51592) 的 DNA 聚合酶，*Thermococcus Peptonophilus* DNA 聚合酶；*Thermococcus stetteri* DNA 聚合酶。

而属于 *Thermus* 属的细菌 DNA 聚合酶有 *Thermus aquaticus* 的 DNA 聚合酶 (Ampli Taq DNA Polymerase (trademark), Perkin elmer)，*Thermus thermophilus* DNA 聚合酶 (Tth DNA Polymerase (trademark), *Thermus flavus*-derived DNA 聚合酶 (Tfl DNA Polymerase (trademark), Promega)，*Thermus Lacteus* (ATCC 31557) DNA 聚合酶、*Thermus rubens* (ATCC31556) 的

DNA 聚合酶、*Thermus ruber* (ATCC 51134) 的 DNA 的聚合酶、*Thermus filiformis* (ATCC 43280) DNA 聚合酶、*Thermus*
Scotoductus (ATCC 27978) DNA 聚合酶。

上述 DNA 聚合酶既可以单独使用，也可以将 2 种以上 (2 种、3 种...) 聚合酶混合使用。同时用两种以上聚合酶聚合脱氧核苷酸与只用 1 种比，一次合成的 DNA 更多样化 (即，可得到碱基序列更多种多样的 DNA (群))，通过这一方式例如在染色体的合成中使可成为染色体 DNA 的 DNA 的含量增高了。

使用的脱氧核苷酸有 dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 若反应体系中存在这 4 种核苷酸或其中 3 种，聚合反应就可进行。

脱氧核苷酸与 DNA 聚合酶的反应最好是在 pH6 附近的弱酸性、中性或 pH10 以下的弱碱性条件下进行。

反应温度和时间可以选择在聚合酶不失活的范围内，20℃ 以上，理想的是大约 60℃ 以上聚合酶表现活性的温度范围下，通过反应 0.5~24 小时，理想的是 1~15 小时，最理想的时间是 2~10 小时，可以使反应快速进行。例如：可以于 74℃ 反应数小时，或者按通常的 PCR 反应条件，如，反复进行如下循环条件下的反应：① 95℃ 下保持 1 分钟、② 45℃ 保持 2 分钟、③ 74℃ 下保持 3 分钟。

反应起初经过若干延迟时间后开始，很快达到最大反应速度。通过本发明的方法合成的 ntp - DNA 是不依赖于可作为模板和引物的 DNA 或 RNA 而只依赖于反应体系中存在的蛋白质 (聚合酶) 的信息合成的。

合成的 DNA 的大小通常在 1kbp~30kbp 之间，可通过反应条件使 DNA 的大小改变。例如若使用 4 种 DNA 的材料：dATP、dGTP、dCTP、dTTP 可以得到 1~30kbp 的 DNA，若使用其中的 3 种，如以 dATP、dCTP、dTTP 为材料，可以得到大约 10kbp 的 DNA，而以 4 种核苷酸为材料的反应体系中加入脱氧核酸酶 I 可以得到大约 10kbp 的 DNA。

这样得到的 ntp - DNA 产物是双链 DNA，其碱基组成，如实施例 12 为 dA: 34.4%、dC: 15.6%；dG: 17.4%；dT: 32.6%。dG 和 dC 的总和是 33%。还有实施例 14 中 DNA 碱基序列里 dTdA、